

بررسی جهش‌های اگزون‌های ۱ و ۲ ناحیه 3'UTR ژن VSX1 در بیماران مبتلا به ورم بهاره ملتحمه‌ی چشم در شهرکرد با استفاده از روش‌های PCR-SSCP/HA و Sequencing

الهه فلاحی^۱، شهریانو پرچمی برجوثی^۲، سمیه رئیسی^۳، دکتر علی صالحی^۴، بهشته امیری^۵، فاطمه هیتی^۶،

دکتر حسین تیموری^۷

نویسنده‌ی مسوول: شهرکرد، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی hteimori@skums.ac.ir

دریافت: ۹۳/۹/۱۱ پذیرش: ۹۴/۴/۴

چکیده

زمینه و هدف: ورم ملتحمه بهاره (Vernal Kerato Conjunctivitis) یک واکنش ایمنی در ارتباط با آنتی ژن‌های محیطی می‌باشد که منجر به التهاب بافت ملتحمه چشم می‌شود. یکی از عوامل ژنتیکی موثر محتمل در این بیماری ژن VSX1 می‌باشد. در مطالعه‌ی حاضر جهش‌های واقع در اگزون ۱، ۲ و 3'UTR ژن VSX1 در بیماران مبتلا به VKC در شهرکرد با استفاده از روش‌های PCR-SSCP و PCR-HA بررسی شد. روش بررسی: در این مطالعه مقطعی، نمونه خون محیطی ۱۰۰ فرد مبتلا به بیماری ورم ملتحمه و همچنین ۱۰۰ فرد که هیچ نوع بیماری چشمی در آنها ثابت نشده بود به عنوان گروه کنترل مورد بررسی قرار گرفت. DNA ژنومی به روش فنول-کلروفرم استخراج شد و توسط PCR تکثیر گردید، سپس با استفاده از محصول PCR، SSCP و HA انجام گرفت و نمونه‌هایی که دارای باندهای متفاوت بودند به منظور تعیین نوع تغییر نوکلئوتیدی توالی یابی شدند. در ادامه، به منظور بررسی نوع تغییر نوکلئوتیدی مشاهده شده از روش RFLP استفاده شد. یافته‌ها: با بررسی نتایج SSCP، ۶ نمونه در اگزون‌های ۱ و ۲ و ۱۳ نمونه در ناحیه 3'UTR دارای باند شیفت بودند که به‌منظور تعیین نوع تغییر نوکلئوتیدی توالی یابی شدند، نتایج توالی یابی یک تغییر چهارچوب (g. ۲۵۰۵۷۵۶۱ delG) در ناحیه 3'UTR نشان داد. در توالی‌های دیگر تغییری مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج این مطالعه به احتمال زیاد ژن VSX1 نقش موثری در بیماری‌زایی VKC در جمعیت مورد مطالعه ندارد. بنابراین در مورد نقش پاتوژن ژن VSX1 در ورم ملتحمه بهاره نیاز به مطالعه بیشتری می‌باشد.

واژگان کلیدی: VSX1، جهش، ورم ملتحمه بهاره، PCR-SSCP، PCR-HA

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک انسانی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد

۲- کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی، کارشناس مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد

۳- دانشجوی دکتری ژنتیک، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری تهران

۴- فوق تخصص چشم پزشکی، استادیار دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

۵- کارشناسی پرستاری، کارشناس مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد

۶- دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک مولکولی، کارشناس مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد

۷- دکترای تخصصی ژنتیک پزشکی، استادیار دانشکده‌ی پزشکی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد

مقدمه

ورم بهاری چشم VKC (Vernal Kerato Conjunctivitis) واکنش ایمنی است که در ارتباط با آنتی ژن های محیطی رخ داده و منجر به التهاب بافت ملتحمه ی چشم می شود. مکانیسم های دقیق بیماری زایی VKC به طور کامل مشخص نشده است ولی به صورت کلاسیک افزایش حساسیت با واسطه IgE و واکنش های با واسطه Th2، نقش اصلی را در بیماری زایی ورم ملتحمه ی بهاره ایفا می کند (۱-۳). بررسی های صورت گرفته به منظور شناسایی ژن های مستعد کننده ی بیماری آلرژی چشمی با تجزیه و تحلیل پیوستگی، نقش مهم فاکتورهای ژنتیکی در این بیماری را تایید می کنند (۴-۶). یکی از ژن های مرتبط با بیماری های شایع چشمی VSX1 (Visual System Homeobox) می باشد. ژن VSX1 متعلق به خانواده هومو باکس ها بوده و حاوی پنج اگزون می باشد. این ژن پروتئینی را رمزدهی می کند که حاوی یک Paired Like Homeodomain بوده و به مرکز لوکوس های ناحیه ی کنترل خوشه ژنی رنگدانه ی سبز و قرمز بنیایی متصل می شود. طبق مطالعات انجام گرفته این ژن یک نوع عملکرد مهارکننده ی رپرسور دارد که می تواند به عنوان یک سرکوبگر رونویسی عمل کند، پروتئین کد شده ممکن است در تنظیم بیان ژن های آپسین مخروطی اولیه در حال توسعه نقش داشته باشد. همچنین ارتباط جهش در VSX1 با بیماری های دیستروپی چند ریخت خلفی قرنیه [MIM:122000]، کراتوکونوس تیپ ۱ [MIM:148300] و ناهنجاری های سر و صورت و قرنیه [MIM:614195] CAASDS تأیید شده است (۷-۱۱). در مطالعات گذشته بر اساس بررسی ارتباط بیماری کراتوکونوس با ژن vsx1، ناحیه 3'UTR نقش تنظیم کننده در میزان بیان این داشته و همچنین تغییرات نوکلئوتیدی مشاهده شده در اگزون های ۱، ۲ و ۳ دارای فراوانی بالاتری بوده است (۱۳ و ۱۲)، با وجود

مطالعات مختلف بر روی بیماری های آلرژی چشمی در ایران، تاکنون ارتباط بین ژن VSX1 و بیماری ورم بهاره مورد بررسی قرار نگرفته است. با توجه به شباهت علایم تشخیصی کراتوکونوس با بیماری ورم ملتحمه ی بهاره این فرضیه مطرح شد که ممکن است بین ژن VSX1 و بیماری ورم ملتحمه بهاره از نظر منشا ژنتیکی بیماری زایی آن ها ارتباط وجود داشته باشد. با توجه به شایع بودن بیماری VKC در استان چهارمحال و بختیاری و همچنین ارتباط بیماری های چشمی با ژن VSX1، در مطالعه ی حاضر برای اولین بار ارتباط جهش ژن VSX1 با بیماری ورم بهاره چشمی در بیماران مبتلا به VKC در این استان مورد بررسی قرار گرفته است. این پژوهش بر اساس بررسی ارتباط جهش اگزون های ۱ و ۲ و همچنین ناحیه 3'UTR این ژن با بیماری VKC انجام گرفته است.

روش بررسی

بیماران: در این مطالعه ی توصیفی -آزمایشگاهی که در مرکز تحقیقات سلولی مولکولی شهرکرد صورت گرفت. ۱۰۰ بیمار مبتلا به VKC و ۱۰۰ فرد غیر بیمار که هیچ نوع بیماری چشمی در آن ها تشخیص داده نشده بود به عنوان گروه کنترل مورد مطالعه قرار گرفتند. تشخیص بیماری بر اساس یافته های بالینی و Corneal Topography بود (۱۴). بیماران در ابتدا به دلیل علایم بیماری مانند خارش شدید چشمی همراه اشک ریزش، ترشحات موکوسی، ترس شدید از نور، اسپاسم پلک ها و احساس جسم خارجی به چشم پزشک مراجعه کرده بودند و در افراد دارای علایم تشخیصی بیماری ورم ملتحمه مانند هیپرپلازی پایلاری در ناحیه ملتحمه تارس و یا وجود ارتشاح بافت های زیر ملتحمه در ناحیه ی لیمبوس، بیماری ورم ملتحمه تایید شد (افراد مورد مطالعه از بین بیماران مبتلا به ورم ملتحمه بهاره که در فاصله ی زمانی آبان تا تیرماه ۹۲ به

کلینیک هاجر شهرکرد مراجعه کرده بودند انتخاب شدند). افرادی که علاوه بر علائم بیماری VKC دارای علائم تشخیصی دیگر بیماری‌های چشمی بودند و همچنین افراد بیمار خویشاوند که عضو یک خانواده بودند از مطالعه خارج شدند و از خانواده‌هایی که دارای چند فرد بیمار بود یک فرد وارد مطالعه شد.

نمونه‌گیری: پس از تشخیص بیماری ابتدا رضایت‌نامه‌ی کتبی از بیماران کسب شد و پس از تکمیل پرسشنامه مربوط به اطلاعات بالینی افراد مبتلا به ورم بهاره، نمونه‌گیری از افراد بیمار به روش آسان انجام شد. از هر فرد ۵ میلی‌لیتر خون محیطی تهیه و برای استفاده در مراحل بعدی در ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد.

انجام آزمایشات مولکولی: استخراج DNA با استفاده از روش فنول- کلروفرم صورت گرفت (۱۵). کیفیت و کمیت DNA با استفاده از روش اسپکتروسکوپی (اسپکتروفتومتر Unico 2100 USA) مورد بررسی قرار گرفت. به‌منظور انجام مرحله PCR، در ابتدا با استفاده از اطلاعاتی مبتنی بر وجود توالی‌هایی موجود در پایگاه داده‌های ژنتیکی (NCBI, UCSC, EMBL) پرایمرهای مورد استفاده برای نواحی اگزون‌های ۱، ۲ و ناحیه 3'UTR با استفاده از نرم‌افزار Primer3 طراحی گردید (جدول ۱). به‌منظور ایجاد نمونه کنترل مثبت که دارای تغییر نوکلئوتیدی باشد از روش جهش‌زایی با PCR استفاده شد به این ترتیب که از پرایمرهای دارای یک نوکلئوتید تغییر یافته در ناحیه نزدیک 3' پرایمر برای تکثیر توالی هدف استفاده شد (جدول ۱). تکثیر توالی نواحی مورد نظر با روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) با استفاده از دستگاه ترمال سایکلر (Astec, PC818 Japan) صورت گرفت. مخلوط واکنش شامل: بافر PCR با غلظت 1X، $MgCl_2$ با غلظت ۱/۵ میلی‌مولار، dNTPs با غلظت ۰/۵ میلی‌مولار، هر کدام از پرایمرها با غلظت ۰/۲ پیکو مول و نهایتاً ۰/۵ واحد از آنزیم Taq پلیمرز (۵ واحد بر

میکرولیتر) تهیه گردید و با استفاده از ۱۰۰ نانوگرم DNA در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر تکثیر توالی هدف صورت گرفت. (تمامی مواد مصرف شده از شرکت سیناژن تهیه شدند). تکثیر توالی DNA اگزون‌های ژن مورد مطالعه با استفاده از شرایط دمایی پایه ۱ سیکل ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد ۳ دقیقه، سپس ۳۵ سیکل، ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد ۴۵ ثانیه، ۵۸ درجه‌ی سانتی‌گراد ۵۰ ثانیه، ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد ۵۰ ثانیه و در نهایت ۵ دقیقه ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد برای یک سیکل به‌منظور تکثیر نهایی مورد استفاده قرار گرفت. به‌منظور مشاهده‌ی کیفیت و کمیت توالی‌های تکثیر یافته، محصول PCR با استفاده از الکتروفورز بر روی ژل آکریل آمید ۸ درصد مورد بررسی قرار گرفت (شرکت مرک آلمان). پس از الکتروفورز، به‌منظور مشاهده‌ی باندهای DNA حاصل، از روش رنگ‌آمیزی نیترا ت نقره استفاده شد (۱۶). واکنش‌های PCR-SSCP (PCR-single strand conformation polymorphism) و PCR-HA (PCR-heteroduplex) با استفاده از محصول PCR بر اساس روش ترجیحی و همکاران صورت گرفت (۱۸ و ۱۷). هرکدام از توالی‌های مورد بررسی با شرایط خاص ژل SSCP مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۲). نمونه‌های دارای باند متفاوت بر روی ژل الکتروفورز SSCP و بررسی هترو دوپلکس به‌منظور تایید نهایی، تعیین توالی گردیدند. واکنش تعیین توالی با استفاده از سیستم ABI (Capillary System) 3730 XL انجام شد. در ادامه این مطالعه، برای بررسی نوع تغییر نوکلئوتیدی مشاهده شده (جهش یا پلی مورفیسم) در نمونه‌های توالی یابی شده اگزون‌های مورد بررسی بیماران، از آنالیز RFLP بر روی نمونه‌های افراد کنترل استفاده شد؛ برای این منظور، برای توالی ناحیه 3'UTR به‌منظور تکثیر کل توالی مورد نظر در یک مرحله PCR پرایمر طراحی شده و تکثیر صورت گرفت. محصول PCR توالی ناحیه 3'UTR با استفاده از آنزیم محدودالایز MboII (GAAGA(N)₁₀) برش یافته و نتایج

با الکتروفورز بر روی ژل اکریل آمید ۸ درصد مشاهده و مورد بررسی قرار گرفت.

جدول ۱: پرایمرهای مورد استفاده در مطالعه

نوع پرایمر	(3' → 5') توالی پرایمر	TM° C
V1/aF	GCAGCCCAATCCTATAAAGC	57.3
V1/aR	GATTACCGGACGTGGAGA	56.0
V1FM*	GCAGCCCAATCCTATCAAGC	
V1/bF	AAGTCCTCTTCTTCTTTCTGTGCCATC	63.4
V1/bR	AAGGGACTGCTGATTGGCTCACTG	64.4
V1FM*	AAGTCCTCTTCTTCTTTCTGTGTCATC	
V2/F	ATCATGCTCGGGAGAGAAGA	57.3
V2/R	AAAATGAGGCAACCATCCAG	55.3
V2FM*	ATCATGCTCGGGAGATAAGA	
V5/aF	GCTCAGGTAGCATTGTTCTGC	59.8
V5/aR	TGATGGAAGGAGAGGAGAAGG	0
V5FM*	GCTCAGGTAGCATTGTTATGC	
V5/bF	TGTGTGCCTTCTGCTTCTCC	59
V5/bR	CACCTCCTACAACACCTCGA	60
V5/FM*	TGTGTGCCTTCTGCTCCTCC	

• توالی پرایمرهای دارای تغییر نوکلئوتیدی برای واکنش جشن‌های زایی با استفاده از PCR

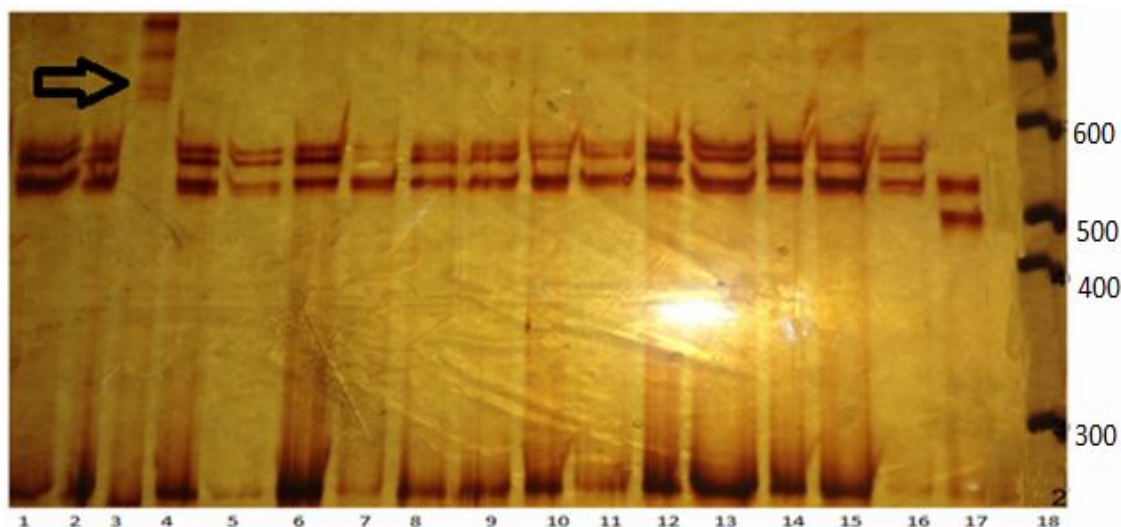
جدول ۲: شرایط تنظیم شده‌ی اگزون‌های ۱، ۲ و ناحیه 3'UTR برای SSCP

سایر ترکیبات	دما	ولتاژ	زمان	غلظت ژل	قطعه تکثیر شده
۱ گرم اوره	۲۰°C	۳۳۰	۶/۳۰ ساعت	۱۰%	قطعه تکثیر شده 1a
۱ گرم اوره	۲۰°C	۳۳۰	۶ ساعت	۱۰%	قطعه تکثیر شده 1b
۱ گرم اوره	۲۲°C	۳۳۰	۶ ساعت	۱۰%	اگزون 2
	۱۲°C	۳۶۰	۶ ساعت	۱۰%	قطعه تکثیر شونده 5a
	۱۲°C	۳۶۰	۶ ساعت	۱۰%	قطعه تکثیر شونده 5b

یافته‌ها

بیماران: در این مطالعه ۱۰۰ بیمار مبتلا به ورم ملتحمه بهاره و ۱۰۰ فرد غیر بیمار به روش RFLP مورد بررسی قرار گرفتند. در این مطالعه افرادی که دارای علائم تشخیصی بیماری VKC بودند مورد بررسی قرار گرفتند و افرادی که علاوه بر علائم بیماری VKC دارای علائم تشخیصی بیماری‌های چشمی دیگر بودند از مطالعه خارج شدند. بررسی نتایج PCR-HA و PCR-SSCP: بررسی نتایج روش

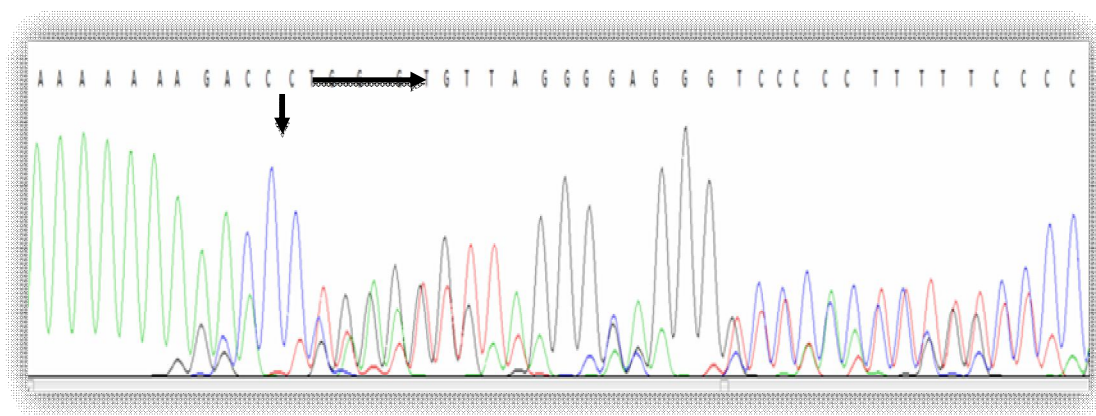
SSCP و هترو دوبلکس اگزون‌های ۱ و ۲ در ۶ نمونه و برای ناحیه پایین دست (3'UTR) در ۱۳ نمونه باند متفاوت نشان داد (شکل ۱). پس از توالی‌یابی DNA تکثیر شده مربوط به نواحی که دارای باند متفاوت بر روی ژل SSCP بودند، تنها یک تغییر نوکلئوتیدی در ناحیه پایین دست ژن VSX1 (پرایمر 5a) مورد تایید قرار گرفت (شکل ۲). نتایج توالی‌یابی هیچ تغییر نوکلئوتیدی در اگزون‌های ۱ و ۲ را نشان نداد و مشاهده باند متفاوت بر روی ژل SSCP به احتمال خطا مرتبط می‌باشد.



شکل ۱: ژل پلی اکریل آمید مربوط به واکنش SSCP و هترو دوپلکس در توالی تکثیر شده ناحیه 3'UTR: ستون ۳ مربوط به فردی می باشد که دارای الگوی بانندی متفاوتی نسبت به دیگر نمونه ها می باشد که پس از تعیین توالی، تغییر نوکلئوتیدی، مورد تأیید قرار گرفت. ستون ۱۷؛ کنترل مثبت (نمونه دارای تغییر نوکلئوتیدی) ستون ۱۸: مارکر ۱۰۰ bp

نوکلئوتید پایین دست کدون پایان در 3'UTR دیده می شود. طبیعتاً به دلیل اینکه این تغییر در خارج از چارچوب خواندن رونویسی ایجاد شده است، اثری بر روی توالی اسید آمینه ای محصول پروتئینی نخواهد داشت (شکل ۲).

در بررسی نتایج SSCP ناحیه 3'UTR، ۱۳ نمونه دارای باند متفاوت بودند که بعد از تعیین توالی، در همه نمونه ها یک تغییر به صورت یک حذف نوکلئوتیدی با الگوی هتروزیگوس در نوکلئوتید G در سیصد و هفتاد و پنجمین



شکل ۲: توالی نوکلئوتیدی واریانت آلی *g.25057561delG* بالا: تغییر هتروزیگوت حذف تک نوکلئوتیدی ناحیه 3'UTR ژن *VSX1*

نوکلئوتیدی *g.25057561delG* را به صورت ناحیه ی بدون جایگاه برش برای آنزیم برشی مورد استفاده نشان داد.

بررسی نتایج RFLP: بررسی نتایج RFLP با استفاده از ۱۰۰ نمونه کنترل، در ۵ نمونه از افراد مورد مطالعه تغییر

بحث

در این مطالعه در توالی اگزون های ۱ و ۲ تغییر نوکلئوتیدی یافت نشد، SSCP قطعات تکثیر شده ناحیه پایین دست در ۱۳ نمونه بیمار تغییر نشان داد که پس از تعیین توالی، تغییر نوکلئوتیدی g.25057561delG در ناحیه ی پایین دست تمام نمونه های دارای باند شیفت مشاهده شد. به دلیل اینکه این تغییر نوکلئوتیدی در مطالعات گذشته گزارش نشده بود (۱۱ و ۱۲)، احتمال حضور این تغییر در افراد کنترل با روش RFLP بررسی شد. نتایج بررسی این تغییر را در ۸ نفر از این افراد نشان داد. ناحیه 3'UTR اغلب شامل نواحی تنظیم کننده می باشد که بعد از مرحله رونویسی بر روی بیان ژن تأثیر می گذارد. این نواحی می توانند پلی آدنیلایسیون، کارایی ترجمه و همچنین پایداری mRNA را تحت تأثیر قرار دهند. ناحیه 3'UTR همچنین شامل جایگاه های اتصال برای پروتئین های تنظیمی و miRNA می باشد؛ مطالعات صورت گرفته بر روی بیان ژن VSX1 نشان داده است که ناحیه 3'UTR ترجمه mRNA مربوط به این ژن را تحت تأثیر قرار داده و سبب کاهش بیان این ژن در سلول های دو قطبی لایه داخلی درون شبکیه شده است و احتمالاً از این طریق بر روی عملکرد پروتئین در سیستم بینایی اثر گذاشته است (۴). یادآور می شود برخی از تغییرات نوکلئوتیدی که باعث تغییر پروتئین شده (p.D144Ep.L159M, p.G160D, p.R166W, p.H244R, and p.P247R) احتمالاً در بیماری زایی کراتوکونوس دخالت دارند که البته در مطالعات بعدی درگیری ژن VSX1 در کراتوکونوس تک گیر و فامیلی و همچنین بیماری زایی PCP آشکار شده است (۱۹). در مطالعه ی دیگری دو تغییر نوکلئوتیدی Asp144Glu and His244Arg علاوه بر افراد بیمار در افراد کنترل نیز مشاهده شدند بنابراین احتمال همراهی آن ها با این بیماری را افزایش داد (۲۱ و ۲۰).

همچنین در مطالعات گذشته همراهی جهش های VSX1 با بدشکلی های برآمدگی قرنیه مورد تأیید قرار گرفته است (۲۰)، اما تاکنون با وجود جهش های گزارش شده در ژن VSX1 در گروه های نژادی مختلف (۲۱)، نقش بیماری زایی تعریف شده ای برای آن ارایه نشده است. با توجه به اینکه جایگاه تغییر مشاهده شده در این مطالعه در چارچوب باز خواندن (ORF1) نمی باشد، همچنین بر اساس اطلاعات به دست آمده از تکنیک RFLP تفاوت معنی داری بین گروه بیمار و کنترل با مقایسه فراوانی تغییر نوکلئوتیدی ذکر شده مشاهده نشد و میزان فراوانی آلی در جمعیت کنترل بیشتر از میزان مورد انتظار برای یک آلل بیماری زا است، بنابراین نتیجه احتمالی این تغییر بر عملکرد یا ساختار پروتئین واضح نیست و جهت شفاف سازی نیاز به مطالعات عملکردی بیشتر و دقیق تر می باشد.

نتیجه گیری

با بررسی مطالعات گذشته و مقایسه ی نتایج آن ها با نتایج مطالعه ی حاضر می توان گفت ژن VSX1 نقش موثری در بیماری زایی ورم ملتحمه بهاره ندارد و نقش این ژن به عنوان پاتوژن ورم ملتحمه بهاره هنوز بحث بر انگیز است و پژوهش حاضر نیز در تأیید مطالعات پیشین، عدم ایفای نقش این ژن در بروز ورم بهاره را تأیید می کند.

تقدیر و تشکر

از معاونت محترم پژوهشی به دلیل حمایت مالی و از کارمندان محترم مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی و همچنین کلیه ی بیماران شرکت کننده در این مطالعه تقدیر و تشکر می گردد. لازم به ذکر است تحقیق حاضر برگرفته از پایان نامه ی کارشناسی ارشد ژنتیک پزشکی می باشد.

References

- 1- Kari O. Atopic conjunctivitis. *Acta Ophthalmologica*. 1988; 66: 381-86.
- 2- Leonardi A. Vernal keratoconjunctivitis: pathogenesis and treatment. *Progress in retinal and eye research*. 2002; 21: 319-39.
- 3- Mantelli F, Lambiase A, Bonini S. A simple and rapid diagnostic algorithm for the detection of ocular allergic diseases. *Current opinion in allergy and clinical immunology*. 2009; 9: 471-76.
- 4- Ajaiyeoba A. Vernal keratoconjunctivitis and intestinal parasitic infestations in black children. *J Nat Med Assoc*. 2005; 97: 1529.
- 5- De Smedt SG, Wildner G, Kestelyn P. Vernal keratoconjunctivitis: an update. *Br J Ophthalmol*. 2013; 97: 9-14.
- 6- Kumar S. Vernal keratoconjunctivitis: a major review. *Acta Ophthalmologica*. 2009; 87: 133-47.
- 7- El-Asrar, Immunopathogenesis of conjunctival remodelling in vernal keratoconjunctivitis. *Eye*. 2005; 20: 71-79.
- 8- Aldave AJ. No VSX1 gene mutations associated with keratoconus. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2006; 47: 2820-22.
- 9- BenEzra D, Matamoros N, Cohen E. Treatment of severe vernal keratoconjunctivitis with cyclosporine A eyedrops. in *Transplantation proceedings*. 1988.
- 10- Eran P. The D144E substitution in the VSX1 gene: a non-pathogenic variant or a disease causing mutation? *Ophthalmic Genetics*. 2008; 29: 53-59.
- 11- Héon E. VSX1: a gene for posterior polymorphous dystrophy and keratoconus. *Human Molecular Genetics*. 2002; 11: 1029-1036.
- 12- Paliwal P. Familial segregation of a VSX1 mutation adds a new dimension to its role in the causation of keratoconus. *Molecular Vision*. 2011; 17: 481.
- 13- Tanwar M. VSX1 gene analysis in keratoconus. *Molecular Vision*. 2010; 16: 2395.
- 14- Bonini S. Vernal keratoconjunctivitis revisited: a case series of 195 patients with long-term followup. *Ophthalmology*. 2000; 107: 1157-63.
- 15- Miller S, Dykes D, Polesky H. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic acids research*. 1988; 16: 1215.
- 16- Rapley B. Influence of extremely low frequency magnetic fields on chromosomes and the mitotic cycle in *Vicia faba* L., the broad bean. *Bioelectromagnetics*. 1998; 19: 152-161.
- 17- Nataraj AJ. Single-strand conformation polymorphism and heteroduplex analysis for gel-based mutation detection. *Electrophoresis*. 1999. 20: 1177-1185.
- 18- Rossetti S. "Microthrix parvicella", a filamentous bacterium causing bulking and foaming in activated sludge systems: a review of current knowledge. *FEMS microbiology reviews*. 2005; 29: 49-64.
- 19- Leonardi A. Effects of Th2 cytokines on expression of collagen, MMP-1, and TIMP-1 in

conjunctival fibroblasts. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2003; 44: 183-189.

20- Mantelli F. Systematic review and meta-analysis of randomised clinical trials on topical treatments for vernal keratoconjunctivitis. *Br J Ophthalmology*. 2007; 91: 1656-1661.

21- Leonardi A. Multiple cytokines in human tear specimens in seasonal and chronic allergic eye disease and in conjunctival fibroblast cultures. *Clin Exper Allergy*. 2006; 36: 777-84.

Mutation Screening of 3'UTR and Exons 1-2 of VSX1 Gene by PCR-SSCP/HA and Sequencing in Patients with Vernal Keratoconjunctivis (VKC) in Shahrekord

Fallahi E¹, Parchami Barjui S¹, Reisi S², Salehi A³, Amiri B¹, Heybati F¹, Teimori H¹

¹Cellular and Molecular Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran

²National Institute for Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran

³Dept. of Ophthalmology, Faculty of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

Corresponding Author: Teimori H, Cellular and Molecular Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran,

E-mail: hteimori@skums.ac.ir

Received: 2 Dec 2014 **Accepted:** 25 Jun 2015

Background and Objective: Vernal Keratoconjunctivis is an immune response in relation to environmental antigens, leading to inflammation of the conjunctiva. One of the presumable genetic factors in VKC is VSX1 gene. In this study, mutations in exon 1, exon 2 and 3'UTR of VSX1 gene in patients with VKC in Shahrekord were investigated by PCR-SSCP and PCR-HA.

Materials and Methods: In this cross-sectional study, peripheral blood samples of 100 patients with VKC and 100 individuals with no confirmed eye disease as control group were investigated. Genomic DNA was extracted by phenol-chloroform method and then PCR was carried out. Then, SSCP and HA were performed and the samples with shifted bands were sequenced for the type of nucleotide change. Afterwards, to investigate the observed nucleotide change, RFLP method was used.

Results: Our SSCP findings revealed six patients with shifted band in exons 1 and 2 and 13 patients in 3'UTR, which were sequenced for nucleotide change. Analysis of sequencing data showed a frameshift change (g. 25057561delG) in 3'UTR. There was no change in other sequences.

Conclusion: The findings of this study showed that, VSX1 gene most probably has no effective role in VKC pathogenesis in the studied population. Therefore, the role of VSX1 genes in VKC pathogens needs further investigation.

Keywords: Mutation, Vernal Keratoconjunctivis, VSX1 gene